

**DIE KANZEROSTATISCHEN WIRKUNGEN SPEZIELLER VISCUM-
PROTEINE – SIGNIFIKANZ UND WIRKUNGSVERLUSTE**

Georg Snajberk

1980

Aus der I. Medizinischen Abteilung des Städtischen
Krankenhauses München-Schwabing

Chefarzt: Professor Dr. Herbert Begemann

DIE KANZEROSTATISCHEN WIRKUNGEN SPEZIELLER VISCUM-
PROTEINE - SIGNIFIKANZ UND WIRKUNGSVERLUSTE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten
Medizin an der Ludwig Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt von

Georg Snajberk

aus München

München 1980



Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof.Dr.H. Begemann

Mitberichterstatter: Prof.Dr.E. Buchborn

Dekan: Prof.Dr.W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
1.1. Kurzer Überblick der Viscum-album-Forschung	1
1.2. Problemstellung	3
2. Material und Methoden	6
2.1. Herstellung von Protein aus Mistelzweigen	6
2.1.1. Extraktion	6
2.1.2. Ammoniumsulfatfällung	6
2.1.3. Dialyse und Extraktionen	6
2.1.4. DEAE-Sephadex-batsch	7
2.1.5. Ammoniumsulfatfällung und Dialyse	7
2.1.6. DEAE-Sephadex-Chromatographie	7
2.1.7. Ammoniumsulfatfällung und Dialyse	7
2.1.8. Lyophilisation	8
2.2. Proteinbestimmung mittels Biuretmethode	8
2.2.1. Biuret Reagenz	9
2.2.2. Durchführung der Bestimmung	9
2.3. SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese	9
2.4. Allgemeine Methodik der Tierversuche	10
2.4.1. Tierhaltung	10
2.4.2. Transplantation von Ascitestumoren	10
2.4.2.1. Ehrlich Ascites	10
2.4.2.2. Sarkom 180 Ascites	10
2.4.2.3. Walker 256 Carzinosarkom Ascites	11
2.4.3. Umwandlung von Ascites in solide Tumoren	11
2.4.3.1. Präparation	11
2.4.3.2. Überimpfung	11
2.5. In vitro Tests mittels Inkubation von Zellsuspensionen	11
2.5.1. Herstellung der Zellsuspensionen	12

2.5.1.1. Ascites Tumor	12
2.5.1.2. Leber- und Nierengewebe der Ratte	12
2.5.2. Durchführung des Versuchs	13
2.5.3. Auswertung	14
2.6. In vivo Versuche	15
2.6.1. Ehrlich-Ascites-Sarkom-Modell bei der Maus, Versuch AM. 1	15
2.6.1.1. Tiermaterial	15
2.6.1.2. Versuchssubstanz	15
2.6.1.3. Versuchsplan	15
2.6.1.4. Zeitschema	16
2.6.1.5. Thymusbestimmung	16
2.6.2. Ehrlich-Ascites-Sarkom-Modell bei der Maus, Versuch AM. 2	17
2.6.3. Überlebenszeitversuch an Walker-256- Carcinosarkom-Ascites-Ratten Versuch SR.1	18
2.6.3.1. Tiermaterial	18
2.6.3.2. Versuchssubstanz	18
2.6.3.3. Versuchsplan	18
2.6.3.4. Zeitschema	18
2.6.4. Überlebenszeitversuch an Walker-256- Carcinosarkom-Ascites-Ratten Versuch SR.2	19
2.6.5. Auswertung	
2.6.5.1. Ascites-Sarkom-Versuch	19
2.6.5.2. Überlebenszeitversuch	19
3. Ergebnisse	20
3.1. In vitro Versuche	20
3.1.1. Einbaustudien	20
3.1.2. SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese	23
3.2. In vivo Versuche	25
3.2.1. Ascites-Sarkom-Modell bei der Maus	25
3.2.1.1. Versuch AM. 1	25
3.2.1.1.1. Tumorgewichte	25

3.2.1.1.2. Thymusgewichte	26
3.2.1.1.3. Korrelation der Variablen	27
3.2.1.2. Versuch AM. 2	28
3.2.2. Überlebenszeitversuch an der Ascites- Ratte	29
3.2.2.1. Versuch SR. 1	29
3.2.2.2. Versuch SR. 2	29
4. Diskussion	31
5. Zusammenfassung	34
6. Literaturzusammenstellung	35



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551913_0008

1. Einleitung

1.1. Kurzer Überblick der Viscum-album-Forschung

Die Mistel, *Viscum album* L., aus der Familie der Loranthazeen, ist eine der ältesten und vielseitigsten Arzneipflanzen.

Aufgrund ihres breit gefächerten Spektrums an Inhalststoffen - allein ihre kanzerostatische Wirkung ist an so verschiedene Stoffklassen wie Polysaccharide (4), Lipide und Proteine (29) gebunden - erstreckt sich die Anwendung der Mistel auf die Behandlung von Arthrosen, Spondylosen und chronischen Gelenkserkrankungen, sie wird als Adjuvans bei Hypertonie und in zunehmendem Maße bei der Nachbehandlung Krebsoperierter zur Metastasen- und Rezidivprophylaxe verwendet (16). Ihre stark immunstimulierende Wirkung wird bei der Therapie von Leukopenien verschiedenster Genese genützt, wobei auch allgemeine Effekte wie Steigerung der Leistungsfähigkeit, Appetitanregung und Schmerzstillung beobachtet werden (8).

In der Volksmedizin dient die Mistel der Behandlung von Epilepsie, Schwindelanfällen und Amenorrhö, in der Homöopathie der Therapie arteriosklerotischer und essentieller Hypertonie, Epilepsie, Arthrosen und Karzinomen (16). Bereits um Christi Geburt hat Celsus, im 16. Jahrhundert Mathioli, die Mistel im Zusammenhang mit Tumorbehandlung erwähnt. Die Mayas in Mittelamerika haben diverse andere Loranthazeen gegen Tumoren verwendet (29).

In den zwanziger Jahren dieses Jahrhunderts führten die Hinweise von Rudolf Steiner über die antitumorale Wirkung der Mistel (16) zur Entwicklung des Präparates Iscador, das in der

Schweiz hergestellt wird.

Weitere Viscum-album-Präparate zur Krebstherapie sind das Omelan (UdSSR), das Necromelin (UdSSR), das Plenosol (BRD) und das Helixor (BRD).

Das Präparat Iscador wurde bereits mit einigem Erfolg bei der Nachbehandlung von Kollum- (4,5), Ovarial- (10), Bronchial- (7,26,27), Mamma- (8,23), und Magen-, Colon- und Rektumkarzinomen (8) eingesetzt.

Seit ca. 1960 bemühte sich die Arbeitsgruppe um Frederic Vester um die Isolierung des tumorhemmenden Prinzips aus der Mistel. Dabei fiel die ungewöhnliche Zusammensetzung der freien Aminosäuren des Mistelpreßsaftes auf (30), was im weiteren zur Isolierung eines basischen Proteinkomplexes mit einem Molekulargewicht von ca. 60 000 führte (29,31,33,34). Dieser Proteinkomplex, bestehend aus 10 Unterfraktionen, inhibierte in eklatant niedrigen Dosierungen (nur etwa 40 bis 80 Moleküle pro Zelle) das Tumorstadium in Mäusen und Ratten, sowie die DNA- und RNA-Synthese von Ascitestumorzellen (35), wobei normale Zellen (Fibroblasten, Thymozyten) nicht gehemmt wurden (12, 37).

Zusammen mit der Erkenntnis, daß die Tumorehemmwirkung von dem nativen Zustand des, im Übrigen sehr leicht denaturierbaren Proteins, abhängt (34), führte dies zur Postulierung einer vollkommen neuartigen Wirkungsweise dieser Substanz: über den Eingriff in die Regulation der Gene. Diese Theorie wird durch die starke Nukleinsäure-Bindungskapazität einiger Proteinkomponenten und ihre frappieren-

de Ähnlichkeit mit Histonen gestützt.

Weiterhin zeigte sich im Tierversuch eine sehr starke Immunstimulation, die sich in der Anregung des Thymuswachstums ausdrückte (24,36, 37).

Andere Arbeitsgruppen befassen sich mit Lektinen (antikörperähnliche Wirkstoffe) und Agglutininen aus der Mistel, die ebenfalls eine spezifisch antitumorale Wirkung zeigen (17,18,19, 20,21,25). Ferner werden die sogenannten, ebenfalls antitumoral wirksamen, Viscotoxine untersucht (14).

Zwei recht gute Übersichten von antroposophischer Seite bringen N. Priemer und O. Prokop in dem Buch "Die Mistel in der Krebsbehandlung" (40).

Trotz der Erfolge, die die Therapie mit Iscador vorweisen kann (s.o.), bleibt die Diskussion um die Wirksamkeit von Mistelextrakten bei der Tumorthherapie nach wie vor kontrovers (9). Dies liegt sicher zum Teil daran, daß bisher, wegen fehlender finanzieller Mittel keine Toxizitätstests (an verschiedenen Säugertierarten) durchgeführt werden konnten. Diese sind jedoch Voraussetzung zur Durchführung einer kontrollierten, klinischen Studie mit unserer Substanz. Nur eine Serie von klinischen Versuchen mit großen Patientenzahlen kann definitiv und statistisch abgesichert die Wirksamkeit der Mistel in der Krebstherapie bestätigen oder widerlegen.

1.2. Problemstellung

Zur Vorbereitung der oben erwähnten klinischen Versuche mit dem im März 1975 aus *Viscum album*

isolierten, bereits als Tumorchemmend und immunstimulierend erkannten Proteinkomplex, wurde dessen Aktivität getestet.

Der Proteinkomplex lag zu Beginn der Versuche seit 25 Monaten gefriergetrocknet in Ampullen bei -18°C im Kühlschrank. Die Versuche zur in vitro Aktivität von VP 16(75)II am Sarkom 180-Ascites und an Leberzellen (s. Methoden) ergaben, aufgrund von Denaturierung, keine spezifisch tumorchemmende Aktivität.

Aus diesem Grunde wurde im Juni 1977 eine neue Aufarbeitung von 112 kg Mistelzweigen durchgeführt. Hierbei ergaben sich folgende zusätzliche Fragestellungen:

1. Von den seit 1958 durchgeführten 52 Aufarbeitungen fand bisher noch keine im Sommer statt (31). Da jedoch, wie in der Literatur berichtet, deutliche jahreszeitliche Unterschiede in der Wirksamkeit des Ausgangsmaterials auftreten können, war es notwendig festzustellen, ob sich durch die jahreszeitlich bedingte Wachstumsphase Aktivitätsveränderungen ergeben haben.
2. Gleichzeitig sollte die neue Aufarbeitung dazu benutzt werden, die möglichen Aktivitätsänderungen, die im Verlauf dieser Aufarbeitung selbst, auftreten, erstmalig lückenlos und mit einer Testmethode zu verfolgen.
3. Ferner sollte im in vivo Versuch an Mäusen ein Zusammenhang zwischen Thymus- und Tumorgroße und zwischen Dosis des Proteinkomplexes und Thymusgröße überprüft werden.

Von jeder Aufarbeitungsstufe wurde je eine Pro-

be abgezweigt, ihr Proteingehalt und die ED 50 in der Hemmung von Ehrlich Ascites bestimmt. Zum qualitativen Vergleich des Proteinmusters der einzelnen Stufen wurde eine SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese durchgeführt. Die wirksamste Fraktion der in drei Eluate aufgetrennten Endstufe wurde dann in vitro an Ehrlich Ascites und Sarkom 180 Ascites-Zellen, ferner an Leber- und Nierenzellen der Ratte, auf ihre spezifisch tumorhemmende Aktivität, entsprechend der unter Methoden beschriebenen Technik untersucht.

Der in vivo Test erfolgte durch Beobachtung der Tumorreduktion von intradorsal übertragenem Ascites-Sarkom an NMRI-Mäusen und der Verlängerung der Überlebenszeit von Wistar-Ratten mit Walker 256-Carzinom-Ascites.

2. Material und Methoden

2.1. Herstellung von Protein aus Mistelzweigen und Entnahme der Proben zur Testung (32)*

2.1.1. Extraktion

112 kg Mistelzweige wurden mit 10 kg Eis im Durchlaufkutter zerkleinert und hydraulisch abgepreßt. Die Preßplatten wurden nochmals mit 20,0 l 0,1 M Ammoniumsulfat aufgenommen und 30 min. im Draismischer extrahiert, anschließend wieder abgepreßt, die Extrakte vereinigt (59 l). Daraus Entnahme der Probe Nr. 1.

2.1.2. Ammoniumsulfatfällung

Der Preßsaft wurde im 100 l Kreiselmischer mit 3,8 M Ammoniumsulfat auf 1,0 M eingestellt, anschließend 2 Std. gerührt und nach Zugabe von 2,5 kg Supercel über drei Kammern der Filterpresse 2 filtriert (72 l). Das Filtrat wurde mit 3,8 M Ammoniumsulfat-(AS)-Lösung auf 1,95 M eingestellt, 5 Std. gerührt und anschließend die Gesamtmenge (108 l) 1 Std. Stock zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen.

2.1.3. Dialyse und Extraktionen

Der AS-Niederschlag wurde mit kaltem dest. Wasser auf 5 l aufgenommen und homogenisiert, anschließend in Viskingschläuche (ϕ 32 mm) gefüllt und 24 Std. gegen fließendes dest. Wasser dialysiert. Das Retentat mußte unter $0,01 \text{ M} = 3,0 \times 10^3 \text{ } \mu\text{S}$ anzeigen. Der pH lag bei ca. 6,0. Das Retentat wurde 30 min. Stock zentrifugiert, der Überstand verworfen. Hier- von wurde die Probe Nr. 2 entnommen.

*) Die Verarbeitung wurde mit dankenswerter Unterstützung der Fa. Boehringer Mannheim, Biochemie- abteilung Tutzing/Obb. und der Fa. Steigerwald, Darmstadt durchgeführt.

Der Niederschlag wurde mit 0,1 M AS (pH 6,0) 3x auf 10 l aufgenommen, extrahiert und jeweils 30 min. Stock zentrifugiert. Die Überstände wurden vereinigt (27 l) und die Probe Nr. 3 abgezweigt. Der Niederschlag wurde verworfen.

2.1.4. DEAE-Sephadex-batch

15 kg DEAE-Sephadex-Austauscher wurden 30 min. lang mit 40 l 0,1 M AS-Lösung, pH 6,0 gerührt, danach abgenutscht und mit 10 l 0,1 M AS nachgewaschen (39 l). Vom Durchlauf wurde die Probe Nr. 4 abgenommen.

2.1.5. AS-Fällung und Dialyse zur Konzentration

Der Durchlauf wurde auf 3,0 M AS gebracht und 1 Std. Stock zentrifugiert, der Überstand verworfen, der Niederschlag konzentriert mit kaltem dest. Wasser aufgenommen und 4 Std. gegen fließendes dest. Wasser dialysiert, bis die Leitfähigkeit im Retentat $0,1 \text{ M} = 2,7 \times 10^4 \mu\text{S}$ anzeigte.

2.1.6. DEAE-Sephadexchromatographie

Das Retentat wurde blank zentrifugiert und auf eine Säule (Höhe 50 cm, ϕ 7 cm) mit vorbereitetem Austauscher (Äquilibriert mit 0,1 M AS-Lösung, pH 6,0) aufgezogen und die Säule am Uvicordschreiber angeschlossen. Die Extinktionskurve des Uvicordschreibers (Abb.1) wurde in vier Bereiche aufgeteilt und der Durchlauf in diesen vier Fraktionen aufgefangen. Probeentnahme bei 51, 52, 53 und 54. Fraktion 54 wurde wegen zu geringer Proteinkonzentration (siehe Tab. 1) verworfen.

2.1.7. AS-Fällung und Dialyse

Die Fraktionen 51, 52 und 53 wurden bei 3,0 M

AS getrennt ausgefällt und 1 Std. Stock zentrifugiert, der Überstand verworfen. Der AS-Niederschlag wurde konzentriert mit kaltem dest. Wasser aufgenommen und über Nacht gegen $4 \times 12 \text{ l } 0,05 \text{ M}$ Kaliumphosphatpuffer, pH 6,5 dialysiert. Die Dialysate wurden blank zentrifugiert und von jeder Fraktion $1/5$ des Volumens abgezweigt, das bis $3,0 \times 10^3 \mu\text{S}$ weiter dialysiert wurde.

2.1.8. Lyophilisation

Die klaren Dialysate wurden getrennt über Glaswolle filtriert und übers Wochenende lyophilisiert, in braune Flaschen abgefüllt und im Kühlschrank bei $+4^\circ\text{C}$ aufbewahrt.

Ausbeute: 19,3 g Lyophilisat.



Abb. 1 Extinktionskurve des Uvicordschreibers

2.2. Proteinbestimmung mittels Biuretmethode

Zur Kontrolle wurde von jeder einzelnen Fraktion des Aufarbeitungsganges eine Proteinbe-

stimmung durchgeführt.

2.2.1. Biuret Reagenz

2,25 g K-Na-Tartrat wurden in 100 ml 0,2 N NaOH gelöst, dann wurden nacheinander 0,75 g $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ und 1,25 g KJ dazugelöst. Jedes Salz muß gelöst sein bevor das nächste gelöst wird. Mit 0,2 N NaOH wurde auf 250 ml aufgefüllt, dann wurde filtriert und die Lösung in braunen Flaschen aufbewahrt. Der Blindwert der Lösung sollte 0,037 bei 546 nm (Schichtdicke 1 cm) betragen.

2.2.2. Durchführung der Bestimmung

Pipettierschema:	Leerwert	Probe	Standart
------------------	----------	-------	----------

Probe (0,5-5mg/ml)	-	100µl	100µl
--------------------	---	-------	-------

Trichloressigsäure	-	200µl	200µl
--------------------	---	-------	-------

3 min. schütteln, scharf zentrifugieren und Überstand abheben

Biuretlösung	500µl	500µl	500µl
--------------	-------	-------	-------

Pellet aufwirbeln, 30 min. bei 27° C schütteln, vor dem Messen mit

H ₂ O verdünnen	500µl	500µl	500µl
----------------------------	-------	-------	-------

Gemessen wurde bei 546 nm gegen Luft. Dann wurde Probelösung und Biuretreagenz mit einer Spatelspitze KCN entfärbt und der Blindwert von der gemessenen Extinktion abgezogen. Der Umrechnungsfaktor des Delta E auf die Proteinmenge wurde mit einer Eichkurve bestimmt.

2.3. SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese *)

Die Elektrophorese wurde nach dem in der Literatur angegebenen Verfahren durchgeführt (15). Es wurden alle vier Zwischenstufen, sowie die

+) Wurde mit großzügiger Unterstützung des Instituts für Physiologische Chemie, München durchgeführt.

drei Eluate der Endstufe des Aufarbeitungsganges und das Protein Nr. II aus einer Aufarbeitung vom Juni 1975, das sich inzwischen als nicht mehr wirksam erwiesen hatte, getestet.

Die Auswertung der Elektrophoresestreifen erfolgte mittels eines Extinktionsschreibers. Die Kurven wurden lediglich zu qualitativen Vergleichszwecken verwendet (Abb. 7)

2.4. Allgemeine Methodik der Tierversuche

2.4.1. Tierhaltung

Mäuse und Ratten wurden in Makrolonkäfigen in getrennten Räumen bei einem ca. zwölfstündigen Hell- und Dunkelrhythmus gehalten. Zur Fütterung wurde Pressfutter der Firma Altromin verwendet. Einmal pro Woche wurden Karotten und Salatblätter verfüttert. Wasser erhielten die Tiere ad libitum.

2.4.2. Transplantation von Ascitestumoren

2.4.2.1. Ehrlich Ascites

Verwendet wurde Ehrlich Ascites, der von NMRI Mäusen des Instituts für Humanpathologie über CB-L Mäuse des Instituts für Hämatologie der GSF, München wieder auf NMRI Mäuse passagiert wurde.

20 - 25 g schweren, männlichen NMRI Mäusen wurde in 7-tägigem Abstand 0,2 ml einer Mischung aus einem Teil Nativ-Ascites und vier Teilen steriler Krebs-Ringer-Lösung in die Bauchhöhle implantiert. Angeh-Rate 100% (28).

2.4.2.2. Sarkom 180-Ascites

Vorgehen analog zu Ehrlich Ascites

2.4.2.3. Walker 256 Carcinosarkom Ascites

Die Transplantation erfolgte in Abständen von drei bis vier Tagen auf männliche oder weibliche, ca. 200 g schwere Wistar-Ratten durch Implantation von 0,2 ml Nativ-Ascites Angeh-Rate 100% (28).

2.4.3. Umwandlung von Ehrlich Ascites Tumoren in Solide Tumoren

2.4.3.1. Präparation

Mehreren Mäusen, die durch Fraktur der Halswirbelsäule getötet worden sind, wurde aus der Peritonealhöhle insgesamt 20 ml Ascites abpunktiert. Der Ascites wurde anschließend in einem 50 ml Zentrifugenglas 5 min. bei 500 Upm. zentrifugiert. 5 ml des Überstandes wurde abpipettiert und verworfen. Das Zentrifugat wurde mit einem Magnetrührer homogenisiert und weiter in Bewegung gehalten. Die Zellzahl wurde in einer Neubauer Zählkammer bestimmt.

2.4.3.2. Überimpfung

Das Rückenfell der Tiere wurde mit 70%-igem Alkohol betupft. Dann wurde jedem Tier 0,2 ml Asciteszentrifugat (ca. $2,0 \times 10^7$ Zellen) unter die Rückenhaut injiziert.

Das Überimpfen erfolgte langsam, innerhalb von ca. 15 Sekunden, da sich dann die Zellsuspension nicht flächenaft verteilt, sondern lokal eng begrenzt bleibt.

2.5. In vitro Tests mittels Inkubation von Zellsuspensionen mit radioaktiven Präkursoren

Die Inkubation der Zellsuspensionen erfolgte nach einem modifizierten Verfahren von Weitzel et. al. (39).

2.5.1. Herstellung der Zellsuspensionen

2.5.1.1. Ascites Tumor

Einer Maus mit 10 Tage altem Ascites Tumor wurde nach Tötung durch Fraktur der Halswirbelsäule der Ascites aus der Peritonealhöhle abpunktiert und sofort mit MEM(Eagle's Minimum Essential Medium (2)) auf eine Zellzahl von ca. $1,5 \times 10^6$ Zellen/ml verdünnt. Die Zellzahl wurde, wie auch bei den folgenden Versuchen in der Neubauer Zählkammer bestimmt.

Zur Zellsuspension wurde Penicillin und Streptomycin bis zu einer Endkonzentration von 10 µg/ml zugegeben.

2.5.1.2. Leber- und Nierengewebe der Ratte

Die Herstellung der Zellsuspensionen erfolgte nach einer modifizierten Methode von Jacob et. al. (11).

Das Organ wurde steril entnommen und in einer Petrischale mit MEM weitgehend von Fett- und Bindegewebe befreit und anschließend in einem kleinen Becherglas mit einer Schere zerkleinert. Die Herstellung der Zellsuspension erfolgte per Hand in einem 15 ml Glas-Teflon-Homogenisator(Potter) mit lose sitzendem Kolben durch zehnmaliges Auf- und Niederdrücken des Stempels. Pro 1 g Feuchtgewebe wurden 2 ml MEM zugegeben.

Alle Arbeitsgänge wurden im Eisbad durchgeführt.

Die so gewonnene Zellsuspension wurde über ein Kupfersieb abfiltriert um größere Zellklumpen zu entfernen. Dann wurde 5 min. bei 1500 Upm. zentrifugiert, die abgesetzten Zellen wurden mit MEM resuspendiert und auf

$1,5 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt. Die Vitalfärbung mit Methylenblau ergab ca. 50% lebensfähige Zellen (28).

Zur Zellsuspension wurde Penicillin und Streptomycin (Endkonzentration $10 \mu\text{g/ml}$) zugesetzt.

2.5.2. Durchführung des Versuchs (37)

Die Zellsuspension wurde in einem 100 ml Zentrifugenglas mit einem Magnetrührer in Bewegung gehalten. Die Einbauversuche wurden mit den Tritium-markierten Präkursoren der DNA- und RNA-Synthese Thymidin und Uridin durchgeführt, wobei das folgende Pipettierschema gewählt wurde:

Kontrolle:	1,0 ml Zellsuspension
	0,1 ml MEM
Probe:	1,0 ml Zellsuspension
	0,1 ml Proteinlösung

Die einzelnen Fraktionen der Ansätze wurden mit Eppendorfpipetten in 10 ml Zentrifugengläser pipettiert, mit Plastikkappen verschlossen und 2 Std. bei 37° im Schüttelwasserbad bei Stufe 6 inkubiert. Jeder Ansatz wurde vierfach durchgeführt.

Nach Ablauf von 2 Std. wurde zu jedem Ansatz 0,1 ml (= $1,0 \mu\text{Ci}$) Tritium-markiertes Thymidin bzw. Uridin zugesetzt und weitere 30 min. bei 37°C inkubiert.

Der Einbau wurde durch abkühlen im Eiswasserbad bei 0°C gestoppt, die Lyse der Zellen und die Fällung der säurelöslichen Fraktion erfolgte durch Zugabe von 1 ml kalter HClO_4 zu jeder Probe.

Die Niederschläge, die die eingebauten Präkursoren enthielten, wurden über Nacht im Kühlschrank bei 4° C stehen gelassen und auf Glasfaserfilter (ø 25 mm) der Fa. Whatman unter leichtem Vakuum der Wasserstrahlpumpe abgesaugt, die Filter zweimal mit eiskalter HClO_4 und zweimal mit Äthanol (96%-ig) gewaschen. Anschließend wurden die Filter bei 50° C getrocknet und in Plastikfläschchen mit 10 ml Szintillator gegeben und 2 Std. stehen gelassen.

Die Zählung der Zerfälle/min. erfolgte im Beckmann-Scintillation-Counter LS 133. Die Zählausbeute beträgt bei diesem Gerät 35%.

2.5.3. Auswertung

Die Hemmung des Einbaus der radioaktiven Präkursoren wurde graphisch ausgewertet. Hierzu wurde die Einbauaktivität des Probeansatzes in Prozent der Aktivität des Kontrollansatzes ausgedrückt und im doppelt logarithmischen Maßstab gegen die Dosis, in $\mu\text{g}/10^6$ Zellen umgerechnet, aufgetragen.

Unter der Voraussetzung, daß die experimentellen Einheiten voneinander unabhängig sind, wurde die Signifikanz der Ergebnisse im Standard-t-Test für den Test auf Unterschiede überprüft.

Die ED 50 wurde als diejenige Dosis in $\mu\text{g}/10^6$ Zellen festgelegt, bei der, gegenüber den Kontrollen eine 50% ige Hemmung der Einbauaktivität vorlag.

2.6. In vivo Versuche

2.6.1. Ehrlich-Ascites-Sarkom-Modell bei der Maus Versuch AM. 1

Das oben genannte Modell entspricht, in modifizierter Form, einem Versuch, der bereits von Vester und Nienhaus am Tumorzentrum Varese (Italien) durchgeführt wurde (24).

2.6.1.1. Tiermaterial

Es wurden 70 Mäuse, sämtlich Männchen des Stammes NMRI im Alter von ca. 5 Wochen, Gewicht ca. 20 g, verwendet.

2.6.1.2. Versuchssubstanz

Als Versuchssubstanz wurde die Charge VP 16 (52a)/77 verwendet, die jeweils in physiol. Kochsalzlösung gelöst wurde.

Als Kontrollen wurden physiol. Kochsalzlösung sowie der Tuberkulose-Impfstoff BCG verwendet.

Die Applikation erfolgte intraperitoneal.

2.6.1.3. Versuchsplan

Es wurden 4 Versuchsgruppen à 10 Tiere gebildet, die sämtlich mit Tumorzellen (2×10^7) subcutan, in den Rücken überimpft wurden. Zwei weitere Gruppen, die ebenfalls Tumorzellen erhielten, wurden als Kontrollgruppen geführt und erhielten Injektionen mit 0,1 ml physiologischer Kochsalzlösung, bzw. mit 0,1 ml BCG. Ferner wurde eine weitere Kontrollgruppe gebildet, die weder Injektionen noch Tumorzellen erhielt.

Den Versuchsgruppen wurden jeweils 0,3; 1,0; 3,0; und 10,0 µg/kg der Versuchssubstanz injiziert.

Die Zuordnung der Tiere zu den Versuchs-

gruppen erfolgte streng zufällig. Der Zufallscode wurde vom Institut für Datenanalyse und Versuchsplanung, München, geliefert, so daß die Tiere von 1 - n fortlaufend nummeriert und dem Code entsprechend zugeordnet wurden.

2.6.1.4. Zeitschema

- Tag 1 : Zuordnung der Tiere zu den Versuchsgruppen
- vom Tag 1 an: tägliche Injektionen über 25 Tage, außer Samstag und Sonntag
- am Tag 8: Tumorüberimpfung
- am Tag 29: Tötung aller Tiere und Autopsie

2.6.1.5. Thymusbestimmung

Zur Quantifizierung der Immunstimulation durch das Versuchsprotein wurde bei den Mäusen der Thymus sorgfältig excidiert, gewogen und in etwa 1 ml physiolog. Kochsalzlösung bei - 18° C bis zur weiteren Verarbeitung eingefroren. Zur genaueren Erfassung der Zellzahl des Thymus wurde eine Bestimmung der DNA nach Burton durchgeführt:

- Vorbereitung der DNA-haltigen Proben
(Analog zur Extraktion von DNA aus E.coli)
Die Probe wurde mit 2,5 N Perchlorsäure angesäuert, bis zu einer Endkonzentration von 0,25 N, und 30 min. in Eis gestellt. Das Präzipitat wurde abzentrifugiert und mit 0,5 ml 0,5 N Perchlorsäure resuspendiert. Es wurden weitere 3,5 ml 0,5 N Perchlorsäure zugegeben und die Suspension wurde während 15 min. auf 70° C erhitzt. Dabei wurde gelegentlich umgerührt. Nach

Zentrifugation wurde der Überstand abgossen und aufbewahrt. Das Sediment wurde nochmals mit 3,0 ml Perchlorsäure extrahiert. Die zwei Extrakte wurde vermischt.

- Herstellung des Diphenylamin-Reagens
1,5 g Diphenylamin p.A. wurden in 100 ml Essigsäure konz. p. A. gelöst. Dazu wurden 1,5 ml konz. Schwefelsäure p.A. gegeben. Das Reagens wurde im Dunkeln aufbewahrt. Vor Gebrauch wurden 0,1 ml einer wässrigen Acetaldehyd-Lösung (16 mg/ml) zu 20 ml Reagens zugegeben. Die Lösung ist mit Acetaldehyd etwa 12 Stunden haltbar.
- Durchführung der Bestimmung
1 ml der DNA-haltigen Lösung wurde mit 2 ml des Diphenylreagens versetzt, ebenso eine DNA Standard-Probe und eine Leer-Probe mit 0,5 N Perchlorsäure. Die Farbe wird während 16 - 20 Std. bei 30° C entwickelt. Die Extinktion wurde bei 600 nm gemessen. Der Test wurde als Doppelbestimmung durchgeführt.

2.6.2. Ehrlich-Ascites-Sarkom-Modell bei der Maus Versuch AM. 2

Der erste Versuch wurde zur Reproduzierung des Ergebnisses wiederholt. Versuchsplan, Zeitschema und die Versuchsubstanz blieben gleich, nur deren Dosierung wurde leicht modifiziert: die Versuchstiere erhielten jeweils 0,03, 0,3, 3,0 und 30,0 µg/kg Protein. Ferner wurde auf die Thymusgrößenbestimmung verzichtet, weswegen sich die unbehandelte Kontroll-

gruppe ohne Tumor und die tumortragende, jedoch mit BCG behandelte Kontrollgruppe erübrigen.

2.6.3. Überlebenszeitversuch an Walker-256-Carcinosarkom-Ascites Ratten, Versuch SR. 1

2.6.3.1. Tiermaterial

Es wurden 30 weibliche Wistar-Ratten von ca. 200 g Gewicht verwendet.

2.6.3.2. Versuchssubstanz

Verwendet wurde die Charge VP 16(52a)77, die jeweils in physiologischer Kochsalzlösung gelöst wurde. Die Applikation erfolgte intra peritoneal. Als Kontrollsubstanz wurde die gleiche Proteincharge, die jedoch 10 min. bei 95° C denaturiert wurde, in der gleichen Dosierung, verwendet.

2.6.3.3. Versuchsplan

Es wurden zwei Versuchsgruppen à 10 Tiere und zwei Kontrollgruppen à 5 Tiere gebildet, die sämtlich mit 0,3 ml Nativ-Ascites überimpft wurden. Die Versuchsgruppen erhielten das Protein in einer Dosierung von jeweils 3,0 und 30,0 µg/kg, die Kontrollgruppen erhielten die gleiche Dosis des denaturierten Proteins.

Die Zuordnung der Tiere zu den Versuchsgruppen erfolgte "blind".

2.6.3.4. Zeitschema

- Tag 1: Zuordnung der Tiere zu den Versuchsgruppen
- von Tag 1 an: Tägliche Injektionen von Versuchssubstanz über 5 Tage
- am Tag 6: Tumorübertragung
- Tag 6-10: Weiterbehandlung

2.6.4. Überlebenszeitversuch an Walker-256-Carcinosarkom Ratten, Versuch SR. 2

Der zweite Versuch wurde analog zum ersten
- mit Ausnahme der folgenden Veränderungen -
durchgeführt:

- Es wurden 4 Gruppen à 12 Tiere gebildet,
davon erhielten je zwei 0,1 ml und 0,5 ml
Ascites intra peritoneal. Jeweils eine der
beiden Tiergruppen war Kontrollgruppe.
- Therapiert wurde diesmal nur mit einer Do-
sisstufe: 30,0 µg/kg VP 16(52a)77.
Die Kontrollen erhielten die gleiche Dosis
des denaturierten Proteins.

2.6.5. Auswertung *)

2.6.5.1. Ascites-Sarkom Versuch

Es wurde die Nullhypothese eines fehlenden
Unterschieds zwischen den verschiedenen Ver-
suchs- bzw. Kontrollgruppen bezüglich der
Messwerte Tumor- und Thymusgröße mittels
Kruskal Wallis Analyse getestet. Ferner wur-
de der Scheffé-Simultan Test (mit gleichlau-
tender Nullhypothese) und ein separater Glo-
baltest für alle Viscum-Gruppen durchgeführt.
Als letztes wurden die Korrelationskoeffizi-
enten für den Zusammenhang von Thymus- und
Tumorgewicht und die Vergleichbarkeit der
beiden Meßmethoden der beiden Thymusgrößen
bestimmt.

2.6.5.2. Überlebenszeitversuch

Es wurde die Nullhypothese eines fehlenden
Unterschieds zwischen den Versuchs- bzw.
Kontrollgruppen bezüglich der Meßwerte Über-
lebenszeit mittels des Wilcoxon-Rangsummen-
Tests geprüft.

*) Die Auswertung wurde mit der dankenswerten Hilfe
des Instituts für Datenanalyse und Versuchspla-
nung, München, durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1. In vitro Versuche

3.1.1. Einbaustudien

Das Mistelprotein der neuen Aufarbeitung erwies sich als hochaktiv.

Aus den Abbildungen 2 und 3 läßt sich eine deutliche Anreicherung der Aktivität der cyto-statischen Komponenten des Proteins ableiten. In Abbildung 4 wird die Aktivität (als Wirkungs-zahl WZ = 100/ED 50) der einzelnen Auf-arbeitungsstufen dargestellt. Die daraus er-mittelte wirksamste Fraktion der Endstufe ist Nr. 52, die auch den höchsten Proteingehalt der Endstufe (Tab. 1) aufweist.

FRAKTION	PROT. GEHALT MG/ML	VOLUMEN L	GES. PROT G	WIRKUNGSZAHL WZ	WZ X GES. PROT
1	55,25	59,00	3259,70	4,2	13,690
2	4,42	74,00	327,10	17,5	5,724
3	1,44	27,00	38,90	55,6	2,163
4	0,29	39,00	11,30	47,6	538
51	3,00	1,07	3,20	22,7	73
52	4,10	1,98	8,12	58,8	477
53	0,30	2,35	0,72	1,6	1
54	0,07	3,20	0,22	-	-

Tab. 1 Einige Daten der Aufarbeitungsstufen
1 - 54

Des weiteren wurde gezeigt, daß die Aktivität der Fraktion 52 auf Tumorzellen von Ehrlich- und Sarkom 180-Ascites spezifisch wirkt, wäh-

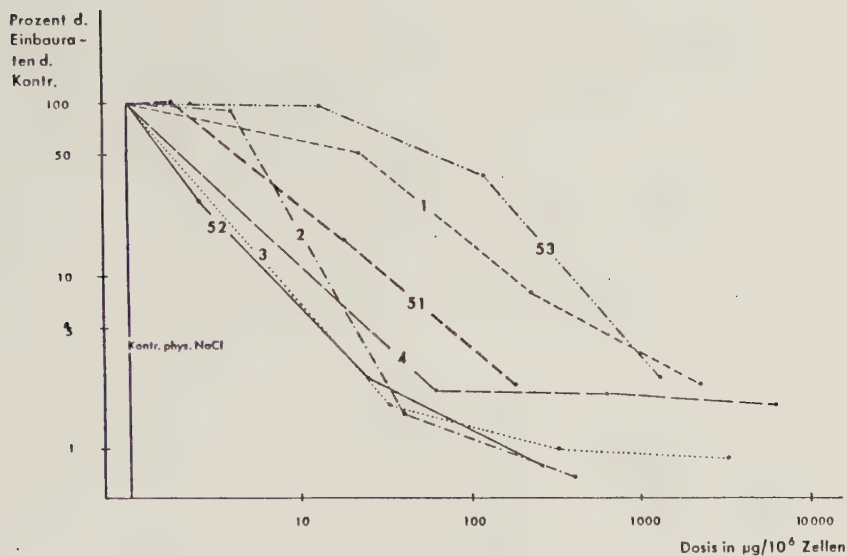


Abb. 2 Hemmung der Einbauraten von Thymidin in Ehrlich-Ascites-Zellen (DNA-Synthese)

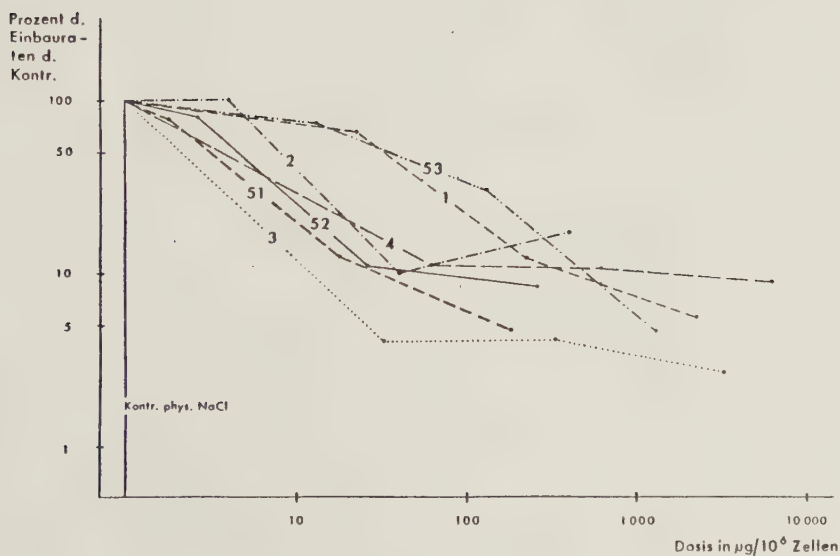


Abb. 3 Hemmung der Einbauraten von Uridin in Ehrlich-Ascites-Zellen (RNA-Synthese)

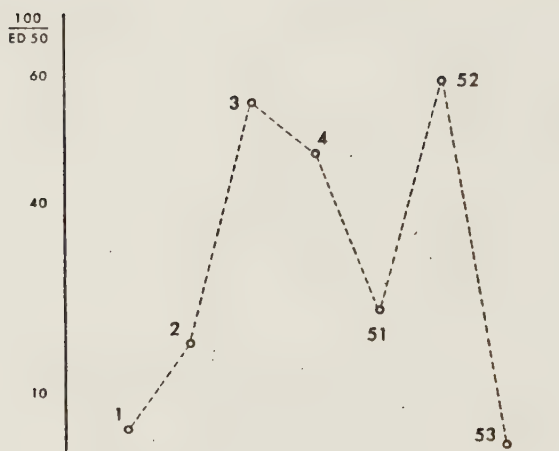


Abb. 4 Die Wirkungszahlen der einzelnen Fraktionen des Aufarbeitungsganges

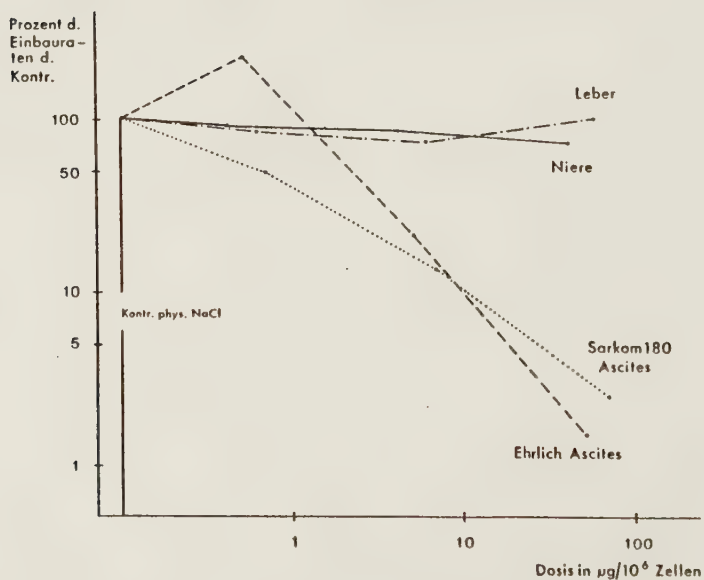


Abb. 5 Vergleich der Einbauraten von Thymin (DNA-Synthese) in verschiedenen Zellkulturen

rend Leber- und Nierenzellen in ihrer Einbauaktivität an radioaktivität von Präkursoren der DNA- und RNA-Synthese nicht gehemmt werden (Abb. 5).

Im Zeitraum vom Juni 1977 bis November 1978 wurde jedoch ein starker Abfall der Hemmaktivität der Probesubstanz 52 gefunden, wobei der stärkste Aktivitätsverlust in den Zeitraum von Januar bis April 1978 fallen dürfte (Abb. 6).

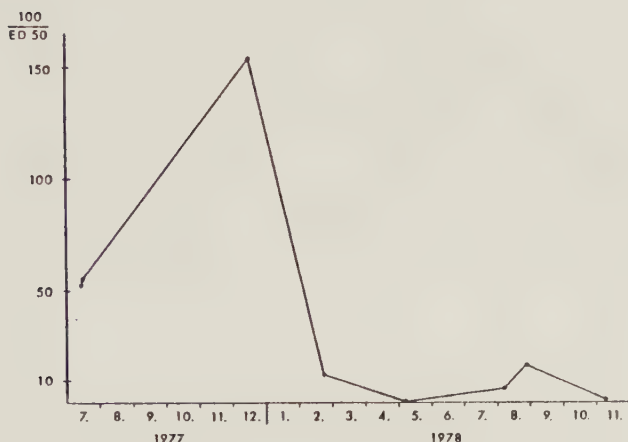


Abb. 6 Verlauf der Aktivität der Probesubstanz 52 über einen Zeitraum von ca. 17 Monaten

3.1.2. SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

Die Abb. 7 gibt die Extinktionskurven der einzelnen Elektrophoreseplatten wieder. Es fällt auf, daß die Fraktion 52 praktisch identisch mit der Substanz Nr. II (inzwischen inaktiver Proteinkomplex VP 16 aus der Aufarbeitung von 1977) ist.

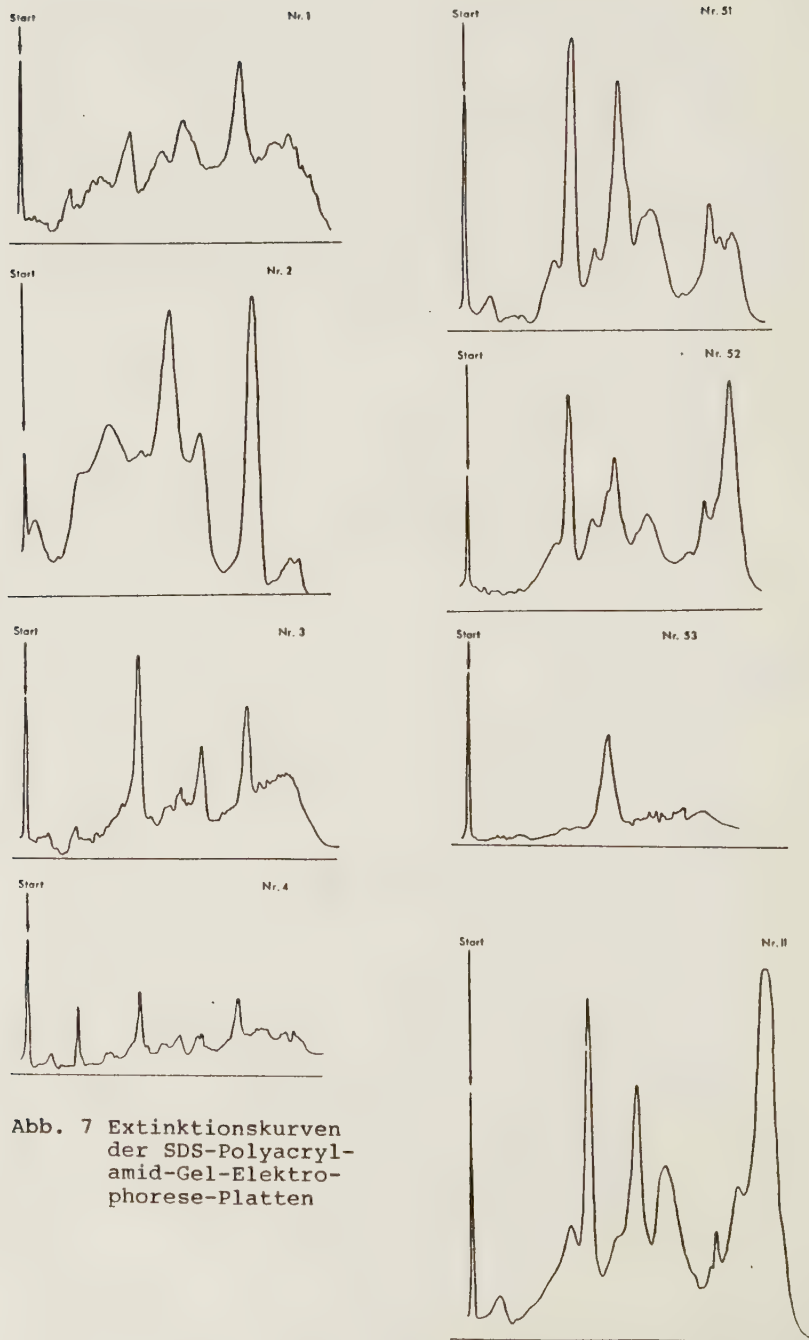


Abb. 7 Extinktionskurven
der SDS-Polyacryl-
amid-Gel-Elektro-
phorese-Platten

3.2. In vivo Versuche

3.2.1. Ascites-Sarkom-Modell bei der Maus

3.2.1.1. Versuch Nr. 1

3.2.1.1.1. Tumorgewichte

Tab. 2 zeigt die gemessenen Werte für das Tumorgewicht in den verschiedenen Versuchsgruppen.

Nach Eliminierung der Ausreißer waren die Werte -was über graphische Analyse geprüft wurde (Wahrscheinlichkeitspapier)- hinreichend normalverteilt. Man sieht, daß die Mittelwerte der vier Versuchsgruppen mit Viscum-Protein kaum von einander unterscheidbar sind, jedoch sämtlich weniger als den halben Wert der Kontrollgruppe aufweisen.

TIER NR.:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	$\bar{x}$
GRUPPE											
A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B	0,20	0,12	0,24	0,23	0,33	0,19	0,24	0,12	0,25	0,35	0,227
C	0,19	0,18	0,15	0,51	0,34	0,20	0,16	0,05	-	-	0,223
D	0,14	-	0,07	0,06	0,02	0,04	0,31	0,10	0,05	0,06	0,100
E	0,16	0,08	0,11	0,07	0,12	0,08	0,07	0,11	0,15	0,14	0,110
F	0,09	0,08	0,10	0,07	0,07	0,10	0,08	0,08	0,06	0,15	0,090
G	0,08	0,07	0,10	-	0,05	0,30	0,10	0,07	0,07	-	0,110

Tab. 2 Versuch Nr. 1: Tumorgewichte in g

(C9 u. C10: keine Tumoren angegangen; D2 u. G4: Einstichstelle eitrig entzündet; G10: Maus gestorben, konnte nicht seziiert werden.)

A: kein Tumor, keine Therapie; D: Tumor, 0,3 µg/kg;
 B: Tumor, 0,1 ml NaCl; E: " , 1,0 µg/kg;
 C: " , =, 1 ml BCG; F: " , 3,0 µg/kg;
 G: " , 10,0 µg/kg.

Die Nullhypothese eines fehlenden Unterschieds zwischen den Versuchsgruppen (getestet mit Kruskal-Wallis Analyse) konnte bereits weit unterhalb des 1%-Niveaus verworfen werden ($H = 23,95$; $FG = 5$; $P = 0,00022$). Die angeschlossenen Folgeteste mittels Scheffé-Simultan-Test ergaben, daß sich die NaCl-Kontrolle (B), signifikant von den 0,3 µg (D)- und 3,0 µg (F)-Gruppen unterscheidet ($P < 0,05$). Der Unterschied zur 10,0 µg (G)-Gruppe verfehlte knapp das 5%-Niveau der Signifikanz. Damit ist die Wirksamkeit der Substanz bis zu einer Dosis von 3,0 µg/kg bewiesen. Ein separat durchgeführter Globaltest für alle Viscumgruppen ergab keinen Hinweis für Unterschiede zwischen den Gruppen ($H = 4,097$; $FG = 3$; $P > 0,05$).

3.2.1.1.2. Thymusgewichte

Tab. 3 gibt die Thymusgewichte, erfaßt als relativen DNA-Gehalt, wieder. Die Unterschiede zwischen den Mittelwerten sind nicht sehr ausgeprägt, es scheint jedoch, daß die NaCl-Gruppe und die beiden niedrig dosierten Viscum-Gruppen niedriger liegen als die anderen. Der Globaltest ergab zwar einen Hinweis für Unterschiede ($H = 12,89$; $FG = 6$; $P = 0,0447$), jedoch konnten die Unterschiede einzeln über den Scheffé-Simultan-Test nicht als signifikant gesichert werden.

Tab. 4 gibt die Meßwerte der Thymusfeuchtgewichte wider. Auch hier ergibt der Globaltest einen Hinweis für Unterschiede ($H = 18,25$; $FG = 6$; $P = 0,0056$), jedoch konnte wiederum keiner der Gruppenvergleiche als signifikant gesichert werden.

TIER Nr.:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	$\bar{x}$
GRUPPE											
A	3,70	3,48	4,81	1,16	5,37	3,74	1,68	2,25	3,97	3,22	3,29
B	3,20	2,81	1,37	4,18	3,10	1,43	3,62	3,00	2,30	2,05	2,65
C	4,23	4,00	5,10	3,25	0,77	2,59	4,69	3,31	5,11	4,42	3,74
D	2,01	2,61	1,88	3,59	3,41	2,20	3,21	2,75	2,73	3,87	2,83
E	2,01	1,86	3,14	2,88	2,67	2,71	2,46	0,54	1,89	3,81	2,40
F	3,02	3,56	2,32	2,80	3,03	3,82	3,10	4,97	4,03	4,38	3,50
G	4,27	1,95	4,42	4,13	1,47	2,96	3,07	2,55	4,90	-	3,30

Tab. 3 Versuch Nr. 1: Thymusgewichte als rel. DNA-Gehalt

TIER Nr.:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	$\bar{x}$
GRUPPE											
A	0,08	0,12	0,09	0,07	0,08	0,08	0,06	0,09	0,09	0,04	0,080
B	0,10	0,11	0,09	0,11	0,09	0,02	0,09	0,09	0,11	0,08	0,089
C	0,11	0,13	0,14	0,09	0,04	0,09	0,16	0,10	0,13	0,14	0,118
D	0,06	0,10	0,04	0,08	0,07	0,07	0,09	0,07	0,09	0,10	0,078
E	0,06	0,08	0,07	0,10	0,08	0,07	0,07	0,03	0,05	0,11	0,072
F	0,10	0,10	0,06	0,11	0,12	0,12	0,11	0,11	0,10	0,10	0,104
G	0,12	0,07	0,18	0,11	0,05	0,12	0,09	0,10	0,14	-	0,109

Tab. 4 Versuch Nr. 1: Thymusfeuchtgewichte in g

3.2.1.1.3. Korrelation der Variablen

Für die Korrelation von Tumorgewicht und Thymusgewicht aus der DNA-Bestimmung ergab sich ein Wert von $\rho = -0,0974$; $P > 0,05$. Für Thymusfeucht- und Tumorgewicht ein Wert von $\rho = -0,3477$; $P < 0,05$.

Damit liegt ein schwach gesicherter Hinweis dafür vor, daß zwischen Tumor- und Thymusfeuchtgewicht ein negativer Zusammenhang besteht.

Ein Hinweis zur Meßgenauigkeit der beiden Thymus-Meßmethoden ergibt sich durch Korrelation dieser beiden Werte. Sie beläuft sich auf $\bar{r} = 0,634$, was nur eine schwache Übereinstimmung wiedergibt.

3.2.1.2. Versuch Nr. 2

In Tab. 5 sind die Tumorgewichte aus dem zweiten Versuch wiedergegeben.

Hier ergab bereits der Globaltest auf Unterschiede zwischen den Gruppen mittels Kruskal-Wallis-Analyse keinen Hinweis für signifikante Unterschiede. ($P > 0,20$).

TIER NR.:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	$\bar{x}$
GRUPPE											
A	0,08	0,11	0,08	0,11	0,20	0,15	0,11	0,07	0,15	0,12	0,118
B	0,08	0,19	0,09	0,08	0,09	0,13	0,10	0,11	-	-	0,108
C	0,09	0,08	0,07	0,07	0,10	0,10	0,16	0,27	0,02	0,11	0,107
D	0,17	0,05	0,13	0,12	0,10	0,11	0,12	0,18	0,37	0,02	0,137
E	0,22	0,09	-	0,03	0,07	0,05	0,06	0,19	0,07	0,07	0,094

Tab. 5 Versuch Nr. 2: Tumorgewichte in g

(B9 u. B10: Mäuse gestorben, konnten nicht seziiert werden; E3: kein Tumor)

A: Tumor, 0,1 ml NaCl; D: Tumor, 3,0 $\mu\text{g/kg}$;
 B: " , 0,03 $\mu\text{g/kg}$; E: " , 30,0 $\mu\text{g/kg}$;
 C: " , 0,3 $\mu\text{g/kg}$;

3.2.2. Überlebenszeit-Versuch an der Ascites-Ratte

3.2.2.1. Versuch SR. 1

In Abb. 8 sind die Überlebenszeiten der Ratten als Grafik widergegeben.

Die Nullhypothese eines fehlenden Unterschieds zwischen den Kontroll- und Versuchsgruppen (überprüft im Wilcoxon-Rangsummen Test) konnte auf dem 5 %-Niveau nicht verworfen werden ($P > 0,08$).

Es konnte also keine signifikante Überlebenszeitverlängerung nachgewiesen werden.

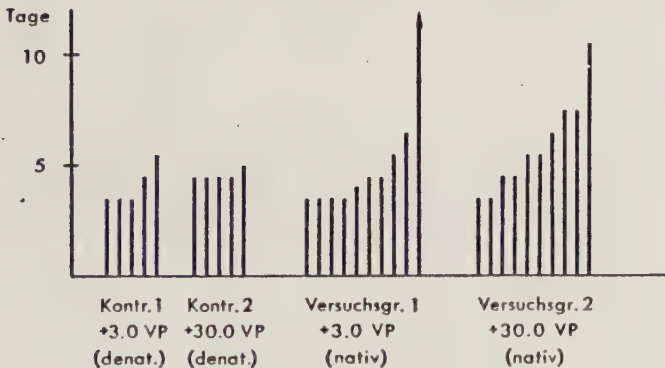


Abb. 8 Versuch SR. 1: Überlebenszeiten von Ratten, sämtlich mit 0,3 ml Ascites beimpft. Pfeil: Ratte hat überlebt.

3.2.2.2. Versuch SR. 2

In Abb. 9 werden die Überlebenszeiten aus dem zweiten Versuch widergegeben.

Die Nullhypothese eines fehlenden Unterschieds zwischen der Kontroll- und Versuchsgruppe mit 0,1 ml Ascites konnte knapp auf dem 5 %-Niveau verworfen werden ($P = 0,053$), was einen schwach gesicherten Hinweis für eine Lebens-

4. Diskussion

Die in vitro Versuche an Ehrlich Ascites, Sarkom 180 und erstmals auch an Leber- und Nierenzellen konnten die in der Literatur angegebene spezifische Hemmung des Einbaus von DNA und RNA in Tumorzellen (29,33,34,37) bestätigen. Die Jahreszeitlich bedingten Schwankungen (33) hatten keinen wesentlichen Einfluß auf die Akti-

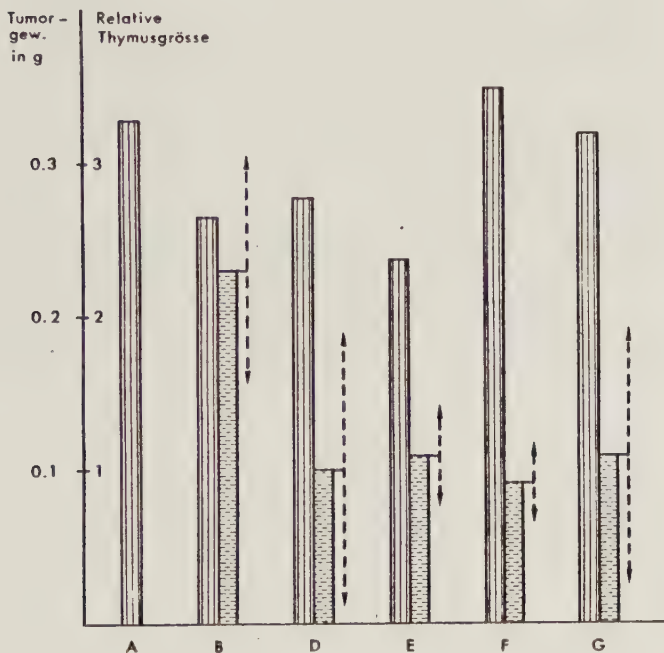


Abb. 10 Versuch AM 1: Thymusgrößen, Tumorreduktion und Standardabweichung im ersten Ascites-Sarkom-Versuch. Therapieschema siehe Tab 2, Seite 25.

▨ Thymusgewichte aus DNA-Bestimmung

▩ Tumorgewichte in g

↔ Standardabweichung der Tumorgewichte

vität dieser Aufarbeitung.

Der im März 1978 durchgeführte erste Tierversuch mit solidem Ehrlich-Ascites-Sarkom führte zu einer signifikanten Tumorreduktion. Rein deskriptiv fällt in der Abb. 10 auf, daß alle behandelten Tumorgruppen ungefähr das gleiche Tumorgewicht haben, das jedoch um die Hälfte kleiner ist als das der Kontrollgruppe.

Einen interessanten Effekt zeigt die Standardabweichung der Tumorgewicht, die mit zunehmender Dosis abnimmt, um dann wieder zuzunehmen.

Möglicherweise wurde bei der Dosis von 10,0 µg/kg bereits das therapeutische Plateau (37) überschritten, so daß die Substanz etwas toxisch gewirkt hätte. Dafür spricht auch, daß in dieser Gruppe zwei Tiere verstarben.

Da die Dosis von 10,0 µg nur etwa 1/10 der angegebenen LD 50 (33,34) beträgt, ist anzunehmen, daß bereits zu diesem Versuchszeitpunkt (März 78) Denaturierungseffekte im Spiel waren. Diese Vermutung bekräftigt der Aktivitätsverlauf des Proteinkomplexes (Abb. 6) zwischen Dezember 77 und März 78.

Beim zweiten Ascites-Sarkom-Versuch (AM. 2) im April 78 zeigte sich dann eine weiter zunehmende Denaturierung des Proteins, denn es konnte keine Tumorreduktion erzielt werden (Tab. 5).

Bei den im September 78 durchgeführten Überlebenszeit-Versuchen (Abb. 8 und 9) muß das Protein bereits derart toxisch gewirkt haben, daß beim zweiten Versuch (SR. 2) eine leichte Verkürzung der Überlebenszeit der mit 30,0 µg/kg therapierten Ratten auftrat. Die schwach signifikante Überlebenszeitverlängerung in der mit 3,0 µg/kg behandelten Gruppe könnte ebenfalls auf eine

direkte toxische Einwirkung auf die Tumorzellen (hier jedoch unspezifisch) zurückzuführen sein.

Die Probesubstanz wurde lyophilisiert, bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt. Es scheint, daß eine vorübergehende Lagerung bei Raumtemperatur, zu einer Beschleunigung des ansonsten langsam vor sich gehenden Aktivitätsverlustes geführt hat.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, daß es sich lohnt die Substanz, unter Berücksichtigung der von Lagerzeit und Temperatur abhängigen Denaturierungsvorgänge, auch klinisch zu untersuchen, denn es besteht die Chance, daß sich eine wirkungsvolle Ergänzungstherapie zur künftigen Rezidiv- und Metastasenprophylaxe entwickeln läßt.

Die in letzter Zeit zunehmende Kritik an der klassischen Krebsbekämpfung (14,38), sowie das steigende Interesse an Mistelinhaltsstoffen (s. Literaturübersicht) könnten den Weg zu dieser neuartigen, gleichzeitig kanzerostatischen und immunsimmulierenden Therapie des Krebses ebnen.

5. Zusammenfassung

Die Inhaltsstoffe der Mistel finden zunehmende Beachtung bei verschiedenen Forschergruppen, es wurden bereits auch diverse Erfolge bei der Krebstherapie berichtet.

In der vorliegenden Arbeit wurden einzelne Stufen des Aufarbeitungsganges in in vitro Tests mittels radioaktiver Präkursoren auf ihre spezifische Aktivität getestet. Ein Protein der Endstufe wurde in vivo Untersuchungen an tumortragenden Mäusen und Ascites-Ratten unterzogen, ferner wurde seine Aktivität über einen Zeitraum von 17 Monaten durch in vitro Untersuchungen verfolgt.

Es zeigten sich folgende Ergebnisse:

- Das Protein der Aufarbeitung war hochaktiv.
- Die Aktivität war spezifisch gegen Tumorzellen und nicht gegen Normalzellen gerichtet.
- Nach ca. 8 Monaten Lagerdauer kam es zu einem steilen Aktivitätsabfall.
- Wegen dieses Aktivitätsabfalls konnte nur in einem der durchgeführten in vivo Versuche eine Tumorreduktion festgestellt werden.
- In einem der Versuche an der Ascites-Ratte zeigte sich eine leichte Verkürzung der Überlebenszeit, was auf toxische Wirkungen des bereits denaturierten Proteins zurückgeführt wird.

Es würde sich lohnen die angegebenen Effekte weiter zu untersuchen, um die Entwicklung eines gleichzeitig immunstimulierenden und kanzerostatischen Therapeutikums ins klinische Stadium voranzutreiben.

5. Literaturzusammenstellung

- 1 Beck, W. Synthese, in vivo- und in vitro-
Purucker, B. Untersuchungen zur tumorhemmenden
Girnth, M. Wirkung von cis-dichloro-dipeptid-
Schönenberger, H. ester-platin(II)-Komplexen
Ruckdeschel, G. Z. Naturforsch. 31b, 832 (1976)
- 2 Eagle, H. Science 130, 433 (1959)
- 3 Evans, M.R. Viscum album - a Possible Treat-
Preece, A.W. ment for Cancer?
Bristol Med. Chir. J. 88(13), 17 (1973)
- 4 Fellmer, Ch. Nachbehandlung bestrahlter Genital-
Fellmer K.E. karzinome mit dem Viscum-album-
Präparat Iscador
Krebsarzt 21, 174 (1966)
- 5 Fellmer K.E. Nachbehandlung bestrahlter Genital-
karzinome mit dem Viscum-album-
Präparat Iscador zur Rezidivpro-
phylaxe
Med. Klin. 62, 305 (1967)
- 6 Franz, H. Isolierung und Charakterisierung
Haustein, B. von Inhaltsstoffen der Mistel
Luther, P. (Viscum album L.)
Kuropka, U. Acta biol. med. germ. 36, 113 (1977)
Kindt, A.
- 7 Gaubatz, E. Die Lebenserwartung der Patienten
mit reseziertem Bronchialcarzinom
nach postoperativer zytostatischer
Nachbehandlung mit Trenimon, Cealysin
und Viscum album
Pneumologie 148, 79 (1973)

- 8 Güntzler, M. Iscadorthérapie in der Nachbar-
Salzer, G. handlung operierter Carzinome
Österr. Ärztezeitung 24,2290 (1969)

- 9 Gutsch, J. Helfen Mistel-Extrakte als Adjuvans
Hoffmann, J. gegen Malignome?
Osswald, H. Selecta 19,1862 (1979)
Schmidt, C.G.
Vester, F.

- 10 Hassauer, W. Welche Erfolgsaussichten bietet
Gutsch, J. die Iscador-Therapie beim fortge-
Burkhardt, R. schrittenen Ovarialcarzinom?
Onkologie (Basel) 2/1,21 (1979)

- 11 Jacob, S.T. A New Method for the Preparation
Bhargava, P.M. of Liver Cell Suspensions
Exp. Cell Res. 27,453 (1962)

- 12 Klammerth, O. Inhibitory Effects of a Protein-
Vester, F. complex from Viscum album on
Kellner, G. Fibroblasts and HeLa-Cells
Z. Physiol. Chem. 349,863 (1968)

- 13 Konopa, J. Isolation of Viscotoxins - Cyto-
Wpynarowski, J.M. toxic Basic Polypeptides from
Lewandowska, M. Viscum album L.
Z. Physiol. Chem. in Vorbereitung

- 14 Kothari, M.L. Cancer: Myths and Realities of
Mehta, L.A. Cause and Cure
Bogars Publ. (1979)
(Eine Übersetzung inzwischen bei
Rohwolt)

- 15 Laemmli, U.K. Cleavage of Structural Proteins
during the Assembly of the Head
Bacteriophage T4
Nature 227,680 (1970)

- 16 List, P.H.
(Hrsg.) Hagers Handbuch der pharmazeuti-
schen Praxis, Band 6, Chemikalien
und Drogen, Teil C, T - Z
Springer Verlag, Berlin (1979)
- 17 Luther, P.
Mehnert, W.H.
Graffi, A.
Prokop, O. Reaktionen einiger antikörperähnli-
cher Substanzen aus Insekten (Pro-
tektine) und Pflanzen (Lectine)
mit Ascites-Tumorzellen
Acta Biol. Med. Germ. 31,K11 (1973)
- 18 Luther, P.
Prokop, O.
Köhler, W. Ein heterophiles Anti-B ("Anti-B_{va}")
aus Extrakten von Viscum album L.
Z. Imm. Forsch. 146,29 (1973)
- 19 Luther, P.
Mehnert, W.H. Zum serologischen Verhalten einiger
handelsüblicher Präparate aus Viscum
album L., insbesondere des Iscador,
in Bezug auf menschliche Blutzellen
und Aszites-Tumorzellen von Mäusen
Acta Biol. Med. Germ. 33,351 (1974)
- 20 Luther, P. Zur Agglutination von menschlichen
Erythrozyten und Ascites-Tumorzell-
len der Maus durch Extrakte aus der
Mistel (Viscum album L.)
Acta Biol. Med. Germ. 35,123 (1976)
- 21 Luther, P.
Franz, H.
Haustein, B.
Bergmann K.-Ch. Isolierung und Charakterisierung
von Inhaltsstoffen der Mistel
(Viscum album) II
Acta Biol. Med. Germ. 36,119 (1977)
- 22 Luther, P.
Sehrt, I.
Bergmann, K.-Ch.
Reutgen, H. Allergie und Lectine: Wechselwir-
kung zwischen IgE-vermittelter
Histamifreisetzung und Glycopro-

teinen aus *Viscum album* L. (Mistel)
Acta Biol. Med. Germ. 37/11,1623 (1978)

- 23 Müller-Färber, J. Unsere Erfahrungen mit der eingeschränkten Mastektomie ohne Nachbestrahlung beim Mammacarzinom
Stickl, R.
Fischer, R.
Med. Welt 26,2003 (1975)
- 24 Nienhaus, J. Thymus Stimulation and Cancer Prophylaxis by *Viscum album*
Stoll, M.
Vester, F.
Experientia 26,523 (1970)
- 25 Pardoe, G.I. Heterophile Agglutinins with a
Bird, G.W.G. Broad-Spectrum Specificity
Uhlenbruck, G. Z. Immun. Forsch. 140,374 (1970)
Sprenger, I.
Heggen, M.
- 26 Salzer, G. Rezidivprophylaxe bei operierten
Havelec, L. Bronchialcarzinom-Patienten mit dem Mistel-Präparat Iscador. Ergebnisse eines klinischen Versuchs aus den Jahren 1969 bis 1971
Onkologie (Basel) 1/6,264 (1978)
- 27 Salzer, G. Die lokale Behandlung maligner
Müller, H. Pleuraergüsse mit dem Mistel-Präparat Iscador
Prax. Klin. Pneumol. 32/11,721 (1978)
- 28 Seidenberger H. In Vitro- und in vivo- Untersuchungen zur tumorhemmenden Wirkung von Cis-dichloro-platinkomplexen mit verschiedenartigen N-haltigen Liganden
Dissertation in Vorbereitung,
München

- 37 Vester, F. Über die kanzerostatischen und
immunogenen Eigenschaften von
Mistelproteinen
Krebsgeschehen 9,5 (1977)
- 38 Vester, F. Krebs- fehlgesteuertes Leben
Henschel, G. Deutscher Taschenbuch Verlag,
München 1977
- 39 Weitzel, G. Untersuchungen zum zytostatischen
Schneider, F. Wirkungsmechanismus der Methyl-
Fretzdorff, A. hydrazine II
Durst, J. Z. Physiol. Chem. 348,433 (1967)
Hirschmann,W.-D.
- 40 Wolf, O. Die Mistel in der Krebsbehandlung
(Hrsg.) Vittorio Klostermann, Frankfurt
1975
- 41 Zizka, P. The Lectin from Viscum album L.
Franz, H. Purification by Biospecific
Kindt, A. Affinity Chromatography
Experientia 34,123 (1978)

Herrn Priv.-Doz. Dr. Frederic Vester
danke ich für die Anregung des Themas
sowie die wissenschaftliche Betreuung
dieser Arbeit und viele fruchtbare
Diskussionen während ihrer Ausführung.

Weiterhin gilt mein Dank Herrn Dr.
Volker Rahlfs für die Hilfe bei der
statistischen Auswertung sowie Herrn
Horst Seidenberger in dessen Labora-
torium ich verschiedene Untersuchun-
gen durchführen durfte.

Lebenslauf

Am 22.1.1954 wurde ich als einziges Kind des Arztes Jaroslav, Emil Snajberk und seiner Frau Nina in Prag geboren.

- | | |
|-----------|---|
| 1960 | Eintritt in die Volksschule in Schlackenwerth. |
| 1966 | Übersiedlung in die BRD und Eintritt in das Gymnasium in Neustadt an der Ostsee |
| 1967-1973 | Besuch des Luitpold-Gymnasiums in Wasserburg am Inn |
| 1973 | Abitur |
| 1973 | Studium der Chemie an der Ludwig-Maximilians-Universität in München |
| 1974 | Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität in München |
| 1975 | Medizinische Vorprüfung |
| 1976 | Erster Teil der Medizinischen Prüfung |
| 1979 | Zweiter Teil der Medizinischen Prüfung |
| 1980 | Dritter Teil der Medizinischen Prüfung und Approbation als Arzt |
| 1980 | Eintritt in die Bundeswehr |

